

**KAJIAN PERBANDINGAN AKTIVITI PENGOKSIDAAN
LIPID SECARA *IN-VITRO* BAGI EKSTRAK *MIMOSA*
PIGRA DAN APLIKASI EKSTRAK SEBAGAI
ANTIOKSIDA DALAM PEMAKANAN TILAPIA**

LEE TZE JIUN

**UNIVERSITI SAINS MALAYSIA
2007**

**KAJIAN PERBANDINGAN AKTIVITI PENGOKSIDAAN LIPID SECARA *IN-VITRO*
BAGI EKSTRAK *MIMOSA PIGRA* DAN APLIKASI EKSTRAK SEBAGAI
ANTIOKSIDA DALAM PEMAKANAN TILAPIA**

Oleh

LEE TZE JIUN

**Tesis yang diserahkan untuk
memenuhi keperluan bagi Ijazah
Sarjana Sains**

April 2007

TO SUCCEED IN LIFE, YOU NEED THREE THINGS:

A WISHBONE,

A BACKBONE

&

A FUNNYBONE.

REBA MCENTIRE

PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya ingin mengucapkan terima kasih kepada penyelia utama saya, Prof. Madya Dr. Shaida Fariza Sulaiman, yang telah banyak memberi nasihat, bimbingan dan tunjuk ajar dari permulaan projek hingga buku tesis ini dihasilkan. Sifat tegas, prihatin dan kepakaran beliau telah mendorong saya mencapai suatu takat yang lebih tinggi lagi bukan sahaja dari segi teknikal, tapi juga dari segi pemikiran yang menjadikan saya lebih kritikal.

Selain itu, saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada penyelia bersama, Prof Roshada Hashim yang telah memberi bimbingan mengenai penternakan ikan sepanjang eksperimen tersebut dilakukan.

Sekalung penghargaan kepada kawan dari lab 306 (Che Pah, Tini, Ka Loon dan Khalidah) yang telah membantu saya sepanjang eksperimen ikan. Tidak lupa juga kepada Kusma, yang telah menolong saya menyiapkan sebahagian ujian UV-Spektrum.

Tidak lupa juga kepada Dr. Gam Lai Harn dan anak muridnya dari Pusat Pengajian Farmasi yang telah membantu saya menganalisis gel elektroforesis dan Encik Abu Bakar dengan penolongnya Kak Shantini, dari Pusat Pengajian Sains Kajihayat, yang telah menolong saya dalam pembikinan slaid hati ikan.

Izinkan saya melaungkan ucapan terima kasih yang tidak terhingga, kepada rakan seperjuangan saya iaitu Loh yang sensitif, Bing yang asyik senyum, Fidah 'the perfect girl', Marisa yang cerdik dan Rozi yang kreatif, yang telah memberi tunjuk ajar dan galakan kepada saya sepanjang projek ini dijalankan.

Kepada Ni Ni, kawan karib saya, terima kasih diucapkan atas sokongan dan galakan yang diberi.

Akhir sekali, kepada mak dan ayah yang memberi sepenuh kepercayaan dan kebebasan kepada saya untuk menjayakan projek ini.

Sekian, terima kasih...

SENARAI KANDUNGAN

	MUKA SURAT
DEDIKASI	ii
PENGHARGAAN	iii
SENARAI KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI PLAT	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xix
BAB 1 PENGENALAN	
1.1 Pengenalan secara am	1
1.2 <i>Mimosa pigra</i> dan aktiviti biologi ekstraknya	2
1.3 Industri akuakultur di Malaysia dan usaha dalam meningkatkan hasil ikan	3
1.4 Objektif kajian	5
BAB 2 TINJAUAN BACAAN	
2.1 <i>Mimosa pigra</i>	7
2.2 Ikan tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	9
2.3 Pengoksidaan lipid	12
2.4 Flavonoid	15
2.4.1 Kesan penggunaan flavonoid pada ikan	17
2.5 Asid lemak	18
2.6 Pengukuran oksidasi lipid secara <i>in-vitro</i> menggunakan ujian ferik tiosianat (FTC) dan asid tiobarbiturik (TBA)	23
2.7 Analisis pertumbuhan ikan	25
2.7.1 Parameter pertumbuhan ikan	25
2.7.1.1 Nisbah penukaran makanan (FCR)	25

2.7.1.2	Nisbah keefisienan protein (PER)	26
2.7.1.3	Kadar pertumbuhan relatif (RGR) dan kadar pertumbuhan spesifik (SGR)	26
2.7.2	Indeks keadaan ikan	28
2.8	Analisis pengoksidaan lipid ikan secara <i>in-vivo</i> pada ikan	28
2.8.1	Kandungan asid lemak	28
2.8.2	Ujian asid tiobarbiturik (TBA)	31
2.8.3	Elektroforesis (Gel poliakrilamida natrium dodesilsulfat)	31
2.8.4	Histologi	32

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Persampelan tumbuhan	35
3.2	Penyediaan sampel	35
3.2.1	Rendaman	35
3.2.2	Rebusan	35
3.3	Kaedah ujian antioksidan	36
3.3.1	Penyediaan bahan kimia	36
3.3.1.1	Etanol 99.5%	36
3.3.1.2	Penyediaan asid linoleik 2.5% dalam etanol 99.5%	36
3.3.1.3	Penyediaan penimbale fosfat 0.05 Molar pH 7.0	36
3.3.1.4	Penyediaan pelarut etanol 75%	37
3.3.1.5	Penyediaan ammonium tiosianat 30%	37
3.3.1.6	Penyediaan larutan asid hidroklorik (HCl) 3.5%	37
3.3.1.7	Penyediaan 2×10^{-2} M ferus klorida dalam HCl 3.5%	37
3.3.1.8	Penyediaan asid trikloroasetik 20%	37
3.3.1.9	Penyediaan larutan asid tiobarbiturik (TBA) 0.67%	37
3.3.1.10	Penyediaan larutan stok sampel	38
3.3.2	Ujian ferik tiosianat (FTC)	38
3.3.3	Ujian asid tiobarbiturik (TBA)	38
3.4	Penyingkiran klorofil daripada sampel ekstrak dengan kaedah kromatografi kertas (<i>in vitro</i>)	39
3.5	Penentuan jumlah fenolik	39
3.5.1	Perbandingan korelasi keputusan nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dan nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak)	40

ekstrak berklorofil dan ekstrak tanpa klorofil	
3.6 Ujian penskrinan fitokimia untuk ekstrak yang menunjukkan aktiviti antioksidasi terbaik	40
3.6.1 Kaedah kromatografi kertas	40
3.6.2 Ujian hidrolisis	41
3.6.3 Kaedah kromatografi lapisan nipis (TLC)	42
3.6.4 Spektrum cahaya nampak-UV	44
3.6.4.1 Penentuan kumpulan hidroksil	44
3.6.4.2 Pengesanan kumpulan orto-dihidroksil	44
3.6.4.3 Pengesanan struktur pada kedudukan 7-hidroksil (7-OH)	45
3.6.4.4 Pengesanan kumpulan orto-dihidroksil dalam flavonoid gelang B	45
3.6.5 Kromatografi cecair dan spektrofotometer jisim (LC-MS)	45
3.7 Penggunaan ekstrak sebagai makanan tambahan ikan dan kesan antioksidasi pada isi ikan	46
3.7.1 Ujian antioksidasi bagi minyak ikan, minyak kelapa sawit dan minyak kacang soya menggunakan FTC dan TBA	46
3.7.2 Penentuan kandungan bahan antioksidasi (dalam mg) yang terdapat di dalam sampel ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) dengan menggunakan ujian FTC sahaja	47
3.7.3 Penggunaan ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) dalam diet tilapia merah (<i>Oreochromis niloticus</i>)	47
3.7.3.1 Rekabentuk eksperimen	48
3.7.3.2 Ramuan makanan	49
3.7.3.3 Komposisi makanan until terumus	49
3.7.3.4 Penyediaan makanan uji	51
3.7.3.5 Analisis data	51
3.7.3.6 Analisis indeks badan dan proksimat isi ikan	52
3.7.3.7 Ujian persampelan	52
3.7.3.8 Analisis kandungan asid lemak dalam isi ikan	53
3.7.3.9 Ujian TBA ke atas isi ikan	55
3.7.3.10 Elektroforesis	55
3.7.3.10.1 Penyediaan ekstrak protein	55
3.7.3.10.2 Gel poliakrilamida (SDS-PAGE)	56

3.7.3.10.3 Penentuan berat molekul	57
3.7.3.11 Histologi	57
3.8 Analisis statistik	58

BAB 4 KEPUTUSAN

4.1 Ujian antioksidasi	61
4.1.1 Ujian Ferik Tiosianat (FTC) bagi 36 ekstrak yang berbeza	61
4.1.2 Ujian Asid Tiobarbiturik (TBA) bagi 36 ekstrak yang berbeza	67
4.1.3 Perbandingan keputusan ujian FTC dan TBA	69
4.2 Ujian FTC dan TBA bagi sampel tanpa klorofil	72
4.3 Ujian jumlah fenolik	79
4.3.1 Perbandingan korelasi keputusan nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dan nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) ekstrak berklorofil dan ekstrak tanpa klorofil	86
4.4 Ujian penskrinan fitokimia	97
4.4.1 Pengenalpastian komponen utama dari ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun)	97
4.4.1.1 Pengenalpastian sebatian subfraksi C1	97
4.4.1.2 Pengenalpastian sebatian subfraksi B1	106
4.5 Penggunaan ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) sebagai makanan tambahan ikan dan kesan antioksidasi pada isi ikan	113
4.5.1 Ujian antioksidasi bagi minyak kelapa sawit, minyak kacang soya dan minyak ikan dalam ujian FTC dan TBA	113
4.5.2 Penentuan kandungan antioksidasi (dalam mg) yang terdapat di dalam sampel ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun)	119
4.5.3 Prestasi tumbesaran tilapia	122
4.5.4 Indeks keadaan badan ikan	126
4.5.5 Faktor fizikal air dan kualiti air	128
4.5.6 Analisis proksimat isi ikan	131
4.5.7 Analisis kandungan asid lemak dalam isi ikan	132
4.5.8 Ujian TBA ke atas isi ikan	138
4.5.9 Elektroforesis (SDS-PAGE)	143

4.5.10 Histologi hepatosit ikan	158
---------------------------------	-----

BAB 5 PERBINCANGAN

5.1 Ujian <i>in-vitro</i>	162
5.1.1 Antioksidan (Ujian FTC dan TBA bagi 36 ekstrak yang berbeza)	162
5.1.2 Ujian FTC dan TBA bagi sampel tanpa klorofil	168
5.1.3 Perbandingan korelasi keputusan nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dan nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) ekstrak berklorofil dan ekstrak tanpa klorofil	170
5.2 Pengenalpastian sebatian utama subfraksi yang terpilih dalam ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun)	173
5.3 Ujian <i>in-vivo</i>	175
5.3.1 Penggunaan ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) sebagai makanan tambahan ikan dan kesan antioksidan pada isi ikan	175
5.3.1.1 Ujian antioksidan ke atas pemilihan jenis minyak (minyak kelapa sawit, minyak kacang soya dan minyak ikan) dalam diet ikan	175
5.3.1.2 Prestasi tumbesaran tilapia	177
5.3.1.3 Kualiti air	179
5.3.1.4 Komposisi asid lemak dalam isi ikan	180
5.3.1.5 Kestabilan pengoksidaan isi ikan	181
5.3.1.6 Kesan antioksidan terhadap kestabilan protein dalam isi ikan	184
5.3.1.7 Kesan antioksidan terhadap isi ikan	187

BAB 6 KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan	190
----------------	-----

RUJUKAN	193
----------------	-----

LAMPIRAN	226
-----------------	-----

SENARAI JADUAL

JADUAL	MUKA SURAT
2.1 Peratusan komposisi asid lemak bagi minyak kacang soya, minyak kelapa sawit dan minyak hati ikan kod	20
3.1 Komposisi proksimat ramuan-ramuan (% dalam berat kering) untuk makanan until terumus	49
3.2 Komposisi diet makanan terumus (gram / 100gram) dan komposisi proksimat diet-diet yang berlainan	50
3.3 Formula pengiraan indeks bagi HSI, VSI dan IPF	52
3.4 Penyediaan gel pemisahan dan gel pemekatan SDS-PAGE	56
4.1 Nilai penyerapan (OD) dan kedudukan sampel-sampel ekstrak (rendaman dan rebusan) pada hari yang ke-10 ujian FTC	64
4.2 Perbandingan kedudukan sampel yang diekstrak menggunakan jenis pelarut, bahagian pokok dan kaedah pengekstrakan yang berlainan	66
4.3 Nilai penyerapan (OD) dan kedudukan oleh sampel-sampel ekstrak (rendaman dan rebusan) pada hari yang ke-11 ujian TBA	68
4.4 Perbandingan kedudukan sampel yang diekstrak menggunakan jenis pelarut, bahagian pokok dan kaedah pengekstrakan yang berlainan	70
4.5 Penentuan kedudukan sebenar berdasarkan kedudukan ujian FTC pada hari ke-10 dan ujian TBA pada hari ke-11	71
4.6 Ujian FTC (hari ke-10) dan TBA (hari ke-11) bagi ekstrak tanpa klorofil	73
4.7 Perbandingan nilai penyerapan FTC dan TBA bagi ekstrak berklorofil, ekstrak tanpa klorofil dan ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun)	76
4.8 Jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) bagi sampel-sampel ekstrak (rendaman dan rebusan)	81
4.9 Perbandingan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) menggunakan pelarut yang berlainan	83
4.10 Perbandingan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) ekstrak berklorofil dengan ekstrak tanpa klorofil	85
4.11 Keputusan korelasi Pearson menunjukkan perhubungan antara ujian nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dengan jumlah	89

fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) ekstrak rendaman dan rebusan secara statistik	
4.12 Keputusan korelasi Pearson menunjukkan perhubungan antara ujian nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) ekstrak rendaman dan rebusan secara statistik	91
4.13 Keputusan korelasi Pearson menunjukkan perhubungan antara ujian nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) sembilan ekstrak tanpa klorofil secara statistik	94
4.14 Keputusan korelasi Pearson menunjukkan perhubungan antara ujian nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) sembilan ekstrak tanpa klorofil secara statistik	95
4.15 Nilai Rf dan warna pada ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) yang disisihkan pada kromatografi kertas dengan menggunakan sistem pelarut asid asetik 15%	98
4.16 Nilai Rf dan warna pada ekstrak fraksi 5 yang disisihkan pada kromatografi kertas dengan menggunakan sistem pelarut BAW	98
4.17 Nilai Rf dan warna sebatian CI pada plat kromatografi lapisan nipis dengan menggunakan sistem pelarut berlainan	99
4.18 Ujian anjakan spektrum, kesan dan diagnosis struktur setelah penambahan reagen-reagen tertentu bagi sampel aglikon C1	102
4.19 Nilai Rf dan warna sebatian B1 pada plat kromatografi lapisan nipis dengan menggunakan sistem pelarut berlainan	106
4.20 Ujian anjakan spektrum, kesan dan diagnosis struktur setelah penambahan reagen-reagen tertentu bagi sampel aglikon B1	109
4.21 Prestasi tumbesaran tilapia pada akhir eksperimen bagi ikan yang mengambil sampel diet yang berlainan	124
4.22 Indeks hepatosomatik, indeks viseralsomatik dan indeks intraperitoneal ikan bagi ikan yang mengambil sampel diet yang berlainan	127
4.23 Nilai purata bagi faktor fizikal air pada semua tangki ternakan sepanjang tempoh eksperimen	129
4.24 Kualiti air bagi sampel diet tilapia yang berlainan	130
4.25 Analisis proksimat isi ikan bagi sampel diet yang berlainan	131
4.26 Komposisi asid lemak (dalam %) bagi isi ikan yang mengambil	133

sampel diet yang berlainan	
4.27 Kedudukan sampel diet berdasarkan nilai penyerapan TBA dari jam pertama hingga jam kelapan.	138
4.28 Keputusan ANOVA dua hala bagi kesignifikanan antara kandungan sampel diet, masa penyimpanan (jam) dan interaksi kandungan sampel diet dengan jangka masa	142
4.29 Perbandingan jumlah jalur protein antara diet-diet mengikut masa	148
4.30 Jumlah jalur protein mengikut tempoh penyimpanan dari jam pertama hingga jam kelapan merujuk kepada Jadual 4.27	152
4.31 Perbandingan jumlah bilangan jalur protein pada masa yang berlainan mengikut diet	153
4.32 Jumlah jalur protein mengikut diet merujuk kepada Jadual 4.29	156
5.1 Indeks kepolaran pelbagai jenis pelarut (Synder, 2004)	166
5.2 Perbandingan peratusan (%) tokoferol di dalam minyak haiwan dan tumbuhan (Kaufmann & Thieme, 1955)	176

SENARAI RAJAH

RAJAH	MUKA SURAT
2.1 Tiga fasa tindak balas pengoksidaan lipid: (1) permulaan, (2) perambatan dan (3) penamatan	13
2.2 Contoh asid lemak yang terdiri daripada gabungan karbon (C), hidrogen (H) dan oksigen (O)	19
2.3 Contoh asid lemak bagi mono dan politaktepu	19
2.4 Contoh asid lemak Omega-3 dan Omega-6	20
2.5 Tindak balas antara asid linoleik dan etanol untuk pembentukan lipid	23
2.6 Ekoran puncak yang menyebabkan kesukaran sistem data menganalisis di manakah puncak tersebut bermula dan berakhir	29
3.1 Penyediaan plat	43
3.2 Contoh kromatogram sampel yang menunjukkan jenis asid lemak dalam bentuk bilangan karbon (contoh C14:0) dan masa retensi pada setiap puncak	54
3.3 Ringkasan ujikaji yang dijalankan dalam penyelidikan ini	59
4.1 Graf nilai penyerapan (OD) bagi pelbagai ekstrak rendaman pada hari pertama hingga hari ke-10 berdasarkan ujian FTC	62
4.2 Graf nilai penyerapan (OD) bagi pelbagai ekstrak rebusan pada hari pertama hingga hari ke-10 berdasarkan ujian FTC	63
4.3 Lengkung piawai asid galik berdasarkan Folin Ciocalteau bagi penentuan jumlah fenolik (GAE)	80
4.4 Perbandingan korelasi antara nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) sampel ekstrak rendaman dan rebusan	87
4.5 Corak perhubungan antara ujian nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) ekstrak rendaman dan rebusan	89
4.6 Perbandingan korelasi antara nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) sampel ekstrak rendaman dan rebusan	90
4.7 Corak perhubungan antara ujian nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) ekstrak rendaman dan rebusan	91

4.8	A dan B masing-masing menunjukkan korelasi antara sembilan sampel ekstrak tanpa klorofil nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dan TBA pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak)	93
4.9	Corak perhubungan antara ujian nilai penyerapan FTC (OD) pada hari ke-10 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) sembilan ekstrak tanpa klorofil	94
4.10	Corak perhubungan antara ujian nilai penyerapan TBA (OD) pada hari ke-11 dengan jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak; TF) sembilan ekstrak tanpa klorofil	95
4.11	Spektrum aglikon C1 asal	100
4.12	Spektrum aglikon C1 selepas penambahan NaOH	100
4.13	Spektrum aglikon C1 selepas penambahan AlCl_3	100
4.14	Spektrum aglikon C1 selepas penambahan AlCl_3 dan HCl	101
4.15	Spektrum aglikon C1 selepas penambahan NaOAc	101
4.16	Spektrum aglikon C1 selepas penambahan NaOAc dan asid borik	101
4.17	Kromatogram sebatian utama di dalam aglikon C1	104
4.18	Spektrum jisim bagi sebatian utama di dalam aglikon C1	104
4.19	Struktur yang dicadangkan bagi aglikon C1	105
4.20	Spektrum aglikon B1 asal	107
4.21	Spektrum aglikon B1 selepas penambahan NaOH	107
4.22	Spektrum aglikon B1 selepas penambahan AlCl_3	107
4.23	Spektrum aglikon B1 selepas penambahan AlCl_3 dan HCl	108
4.24	Spektrum aglikon B1 selepas penambahan NaOAc	108
4.25	Spektrum aglikon B1 selepas penambahan NaOAc dan asid borik	108
4.26	Kromatogram sebatian utama di dalam aglikon B1	111
4.27	Spektrum jisim bagi sebatian utama di dalam aglikon B1	111
4.28	Struktur yang dicadangkan bagi aglikon B1	112
4.29	Graf nilai penyerapan (OD) bagi minyak kelapa sawit (PO), minyak kacang soya (SY) dan minyak ikan (FO) yang diuji bersama sampel kawalan positif (BHT), ekstrak rebusan air suling dan kawalan negatif masing-masing dari hari pertama hingga hari ke-10 berdasarkan ujian FTC	114
4.30	A, B dan C menunjukkan histogram perbandingan nilai penyerapan (OD) apabila minyak kelapa sawit (PO), minyak kacang soya (SY) dan minyak ikan (FO) masing-masing digunakan pada hari ke-10 berdasarkan ujian FTC	116

4.31 A, B dan C menunjukkan histogram perbandingan nilai penyerapan (OD) apabila minyak kelapa sawit (PO), minyak kacang soya (SY) dan minyak ikan (FO) masing-masing digunakan pada hari ke-11 berdasarkan ujian TBA	118
4.32 Perbandingan nilai penyerapan (OD) antara sampel BHT (4 mg) dengan ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) (dari 4 mg hingga 11 mg) pada hari pertama hingga hari ke-10 ujian FTC masing-masing	120
4.33 Perbandingan antara sampel kawalan (BHT) dengan sampel 10 mg dan 11 mg dari hari pertama hingga hari ke-10 dengan menggunakan ujian FTC	121
4.34 Peratus kadar pertumbuhan relatif (RGR) ikan yang diberi makan sampel diet yang berlainan pada setiap dua minggu sepanjang tempoh eksperimen	123
4.35 Nilai penyerapan (OD) pada jam pertama hingga kelapan bagi BHT (4 mg) dan sampel diet yang berlainan berdasarkan ujian TBA	139
5.1 Kromatogram menunjukkan pigmen-pigmen klorofil yang terpisah melalui kromatografi kertas (Lee & Liew, 1997)	170
5.2 Struktur BHT	182
5.3 Struktur membran plasma (a) keratan rentas (b) dalam bentuk tiga dimensi (Lee & Liew, 1997)	184

SENARAI PLAT

Plat	Muka surat
2.1 Pokok <i>Mimosa pigra</i>	8
2.2 Bunga <i>Mimosa pigra</i>	8
2.3 Daun dan kekacang <i>Mimosa pigra</i>	8
2.4 Ikan tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	11
4.1 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam pertama	144
4.2 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam kedua	144
4.3 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam ketiga	145
4.4 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam keempat	145
4.5 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam kelima	146
4.6 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam keenam	146
4.7 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam ketujuh	147
4.8 Gel imej SDS-PAGE bagi ekstrak isi tilapia yang diberi diet ekstrak yang berlainan dan BHT pada jam kelapan	147
4.9 Hepatosit ikan dengan pengambilan diet kawalan (BHT)	159
4.10 Hepatosit ikan dengan pengambilan diet 1 (10 mg)	159
4.11 Hepatosit ikan dengan pengambilan diet 2 (15 mg)	160
4.12 Hepatosit ikan dengan pengambilan diet 3 (20 mg)	160
4.13 Hepatosit ikan dengan pengambilan diet 4 (25 mg)	161
4.14 Hepatosit ikan dengan pengambilan diet 5 (30 mg)	161

**KAJIAN PERBANDINGAN AKTIVITI PENGOKSIDAAN LIPID SECARA *IN-VITRO*
BAGI EKSTRAK *MIMOSA PIGRA* DAN APLIKASI EKSTRAK SEBAGAI
ANTIOKSIDA DALAM PEMAKANAN TILAPIA**

ABSTRAK

Sebanyak 36 ekstrak *Mimosa pigra* telah diuji aktiviti antioksidanya dengan menggunakan ujian ferik tiosianat (FTC) dan asid tiobarbiturik (TBA). Didapati ekstrak rendaman air suling (daun) mempunyai aktiviti antioksidasi terbaik dalam ujian FTC, manakala ekstrak rebusan etil asetat (campuran batang, ranting dan daun) mempunyai aktiviti antioksidasi terbaik dalam ujian TBA. Secara keseluruhannya, didapati ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) mempunyai aktiviti antioksidasi terbaik dalam kedua-dua ujian. Kajian diteruskan dengan memilih sembilan ekstrak terbaik antioksidasi daripada 36 sampel tadi untuk menjalani ujian aktiviti antioksidasi (ekstrak disingkirkan klorofil dengan menggunakan kaedah kromatografi kertas) [tujuh dari ekstrak rebusan iaitu metanol (campuran batang, ranting dan daun), metanol 80% (campuran batang, ranting dan daun), etanol 70% (campuran batang, ranting dan daun), etil asetat (campuran batang, ranting dan daun), metanol 80% (batang), metanol (daun), etanol (daun); dua dari ekstrak rendaman iaitu etanol 70% (batang) dan etil asetat (batang)]. Dalam ujian ini, sampel ekstrak air suling diabaikan dalam pemilihan ini kerana ketiadaan klorofil semasa pengekstrakan dilakukan. Didapati ekstrak rebusan metanol 80% tanpa klorofil (campuran batang, ranting dan daun) menunjukkan aktiviti antioksidasi terbaik dalam ujian FTC manakala ekstrak rendaman etanol 70% tanpa klorofil (batang) menunjukkan aktiviti antioksidasi terbaik dalam ujian TBA. Secara keseluruhannya, ekstrak rendaman etanol 70% tanpa klorofil (batang) menunjukkan aktiviti antioksidasi terbaik dalam ujian tersebut. Dengan membuat perbandingan antara ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) dengan ekstrak rendaman etanol 70% tanpa klorofil (batang), didapati ekstrak rebusan air suling (campuran batang,

ranting dan daun) masih menunjukkan aktiviti antioksidasi yang lebih tinggi daripada ekstrak rendaman etanol 70% tanpa klorofil (batang). Maka, ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) digunakan sebagai makanan tambahan dalam diet ikan secara *in-vivo*.

Selain menjalani ujian FTC dan TBA, ujian jumlah fenolik juga dilakukan ke atas kesemua sampel ekstrak termasuk sampel tanpa atau berklorofil. Didapati ekstrak rendaman etil asetat (daun) mempunyai kandungan fenolik tertinggi (211 ± 0.006 mgGAE/g ekstrak). Korelasi yang rendah antara ujian antioksidasi (FTC dan TBA) kesemua sampel ekstrak tanpa dan berklorofil dengan ujian jumlah fenolik kecuali ekstrak berklorofil ujian TBA yang menunjukkan semakin baik aktiviti antioksidasi, semakin banyak jumlah fenolik dan sebaliknya. Penskrinan fitokimia dijalankan terhadap ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) dengan menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis (TLC), UV-spektrum cahaya nampak dan kromatografi cecair dan spektrofotometer jisim (LCMS). Dua sebatian utama (C1 dan B1) daripada kumpulan flavonoid iaitu biflavonoid dan flavonoid yang terikat kepada kumpulan isoprenoid dikesan dalam ekstrak tersebut.

Lima diet ikan telah diformulasikan dengan masing-masing mengandungi 10, 15, 20, 25 dan 30 miligram ekstrak rebusan air suling (campuran batang, ranting dan daun) dan 4 miligram BHT sebagai diet kawalan. Eksperimen ini dijalankan selama lapan minggu. Didapati ikan diet 3 (20 mg) mempunyai penambahan berat badan, kadar pertumbuhan relatif (RGR), kadar pertumbuhan spesifik (SGR) dan nisbah kecekapan protein (PER) yang terbaik. Manakala ikan diet 4 (25 mg) mempunyai nisbah penukaran makanan (FCR) yang terbaik. Tiada perbezaan signifikan ($P > 0.05$) dikesan antara indeks hepatosomatik (HSI), indeks viseralsomatik (VSI) dan indeks intraperitoneal (IPF) antara diet-diet.

Berdasarkan keputusan analisis asid lemak dalam isi ikan, didapati isi ikan yang diberi diet ekstrak air suling dengan berat yang semakin meningkat mempunyai nilai peratusan 16 jenis asid lemak yang lebih tinggi daripada diet kawalan (BHT).

Keputusan TBA pula menunjukkan diet kawalan (BHT) mempunyai nilai tertinggi sepanjang tempoh penyimpanan dan diet 5 (30 mg) mempunyai nilai terendah sepanjang tempoh penyimpanan kecuali pada jam kedua dan kelima. Keputusan elektroforesis (SDS-PAGE) menunjukkan diet 4 (25 mg) mempunyai jumlah jalur protein terbanyak (185) dan diet 3 (20 mg) mempunyai jumlah jalur protein terendah (152).

Keputusan histologi menunjukkan keberkesanan ekstrak yang semakin meningkat beratnya dapat menghalang pengoksidaan lipid dalam hati ikan (pembengkakan sitoplasmik yang besar), manakala hati ikan diet kawalan (BHT) mungkin mengalami atrofi (pengecutan sel hepatik). Ini menunjukkan bahawa aktiviti antioksidan ekstrak air suling (campuran batang, ranting dan daun) bukan sahaja dapat menghalang oksidasi lipid pada isi ikan, malah juga pada hati ikan.

**A COMPARATIVE STUDY ON IN-VITRO LIPID PEROXIDATION ACTIVITY OF
MIMOSA PIGRA EXTRACTS AND APPLICATION OF EXTRACT AS
ANTIOXIDANT IN TILAPIA DIET**

ABSTRACT

The antioxidant activities of 36 samples were evaluated by using ferric thiocyanate (FTC) and thiobarbituric acid (TBA) assays. FTC result showed that leaves extract that was soaked in distilled had the best antioxidant activity. Meanwhile stems and leaves extract that was boiled in ethyl acetate has the best antioxidant activity in TBA assay. Overall, boiling distilled water extract (of stems and leaves mixture) has the best antioxidant activity in both assays. The experiment was further proceed by choosing nine out of 36 samples (extracted out the chlorophylls by using paper chromatography technique) to run the antioxidant activities test [seven boiled extracts which were methanol (stems and leaves mixture), 80% methanol (stems and leaves mixture), 70% ethanol (stems and leaves mixture), ethyl acetate (stems and leaves mixture), 80% methanol (stems), methanol (leaves), ethanol (leaves); two soaked extracts which were 70% ethanol (stems) and ethyl acetate (stems)]. In this test, distilled water extracts were neglected because of the absence of chlorophylls during extraction. FTC result showed that boiled 80% methanol extract without chlorophylls (stems and leaves mixture) has the best antioxidant activity. Meanwhile stem extract soaked with 70% ethanol without chlorophylls has the best antioxidant activity in TBA assay. Overall, soaked 70% ethanol extract without chlorophylls (stems) proved to have the best antioxidant activity. A comparison has been made between the boiled distilled water extract (stems and leaves mixture) and the soaked 70% ethanol extract without chlorophylls (stems). It is found that boiled distilled water extract (stems and leaves mixture) had the best antioxidant activity. Therefore, the boiled

distilled water extract (stems and leaves mixture) was used in fish diet and tested *in-vivo*.

The present study was also designed to estimate total phenolic content of all the samples including with and without chlorophylls samples. The result has shown that soaked ethyl acetate extract (leaves) had the highest phenolic content (211 ± 0.006 mgGAE/g extract). A low correlation between antioxidant assays (FTC and TBA) and total phenolic for all the samples (with and without chlorophylls) except for the chlorophylls samples from TBA assay, which showed the increased in antioxidant activity as total phenolic increases. Phytochemical screening was carried out on the boiled distilled water extract (stems and leaves mixture) by using thin layer chromatography (TLC), UV-visible spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry (LCMS). Two major compounds (C1 and B1) from flavonoids class (biflavonoids and isoprenoid-substituted flavonoid) has detected in the boiled distilled water extract (stems and leaves mixture).

Five fish diets were formulated which contained 0, 15, 20, 25 and 30 milligrams of the boiling distilled water extracts (stem and leaf mixture) and 4 milligrams of BHT as a control diet. The experiment was conducted for eight weeks. The results showed that fish fed with diet 3 (20 mg) had the best weight gain, relative growth rate (RGR), specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (PER). Meanwhile, fish fed with diet 4 (25 mg) had the best food conversion ratio (FCR). However, there were no significant difference ($P > 0.05$) between hepatosomatic index (HSI), viserasomatic index (VSI) and intraperitoneal index (IPF) within all tested samples.

The fatty acid composition results showed that diet with increasing weight of extract has percentage values of 16 types of fatty acids higher than the control diet (BHT). TBA results showed that the control diet (BHT) has the highest values throughout the whole storage period and diet 5 (30 mg) has the lowest TBA values throughout the whole storage period except at the 2nd and 5th hour. The results from

electrophoresis (SDS-PAGE) showed that diet 4 (25 mg) had the highest number of protein bands (185) and on contrary, diet 3 (20 mg) had the lowest number of protein bands (152).

The histology result showed that fish fed the increment in the extract weight can inhibit lipid peroxidation in liver (increased in the cytoplasmic vacuolation), meanwhile hepatic cells of fish fed with control diet (BHT) may undergo a physiological change which is called atrophy (decrease in cellular size). Overall, the results showed that the antioxidant activity of boiled distilled water extract (stems and leaves mixture), can inhibit lipid oxidation whether in muscle or tilapia's liver.

BAB 1 PENGENALAN

1.1 Pengenalan secara am

Sejak kebelakangan ini, banyak tumpuan telah difokuskan terhadap penambahan bahan antioksidasi di dalam makanan sebagai langkah pencegahan pelbagai penyakit yang kian meningkat. Antioksidasi yang dikatakan mampu menghalang kerosakan oksidasi pada biomolekul seperti protein, lipid dan DNA yang disebabkan oleh radikal bebas boleh didapati secara sintetik dan semulajadi. Contoh antioksidasi sintetik seperti butil hidroksianisol (BHA) dan butil hidroksitolun (BHT) telahpun dihadkan penggunaannya di dalam makanan (Cakir *et al.*, 2003; Zainol *et al.*, 2003) kerana disyaki mempunyai kesan karsinogenik (Madahavi *et al.*, 1995). Oleh itu, penyelidikan terhadap antioksidasi semulajadi daripada tumbuh-tumbuhan telahpun giat dijalankan (Yen & Duh, 1995).

Sebatian fenolik merupakan kumpulan antioksidasi yang banyak terdapat di dalam ekstrak tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan yang berbeza dari segi kandungan dan struktur komponen fenolik (bilangan cincin fenolik, penggantian aromatik, gabungan dengan kumpulan fenolik lain atau asid organik) akan mempunyai aktiviti antioksidasi yang berlainan (Maisuthisakul *et al.*, 2007b). Antara komponen fenolik yang lazim dijumpai ialah flavonoid. Flavonoid merupakan kumpulan terbesar bagi metabolik sekunder tumbuhan, di mana ia mengandungi lima bahagian kecil yang lain iaitu antosianin, flavonol, flavon, katekin dan flavanon (Lu *et al.*, 2006). Flavonoid berfungsi sebagai antimutagenik, antikarsinogenik (Formica & Regelson, 1995), antioksidasi (Rice-Evan, 1996), anti lipid peroksidasi (Pennycooke *et al.*, 2004) dan lain-lain lagi. Ia dikatakan banyak terdapat pada tumbuhan jenis legum di mana ia berfungsi sebagai antioksidasi semulajadi, yang mewakili kumpulan bioaktif terpenting dalam makanan dan ia mampu menghalang pelbagai jenis penyakit seperti kanser dan ateroskelosis (Kupulainen & Salonen, 1996). Selain itu, legum juga merupakan

sumber makronutrien protein, karbohidrat dan serat bagi seluruh masyarakat dunia (Duenas *et al.*, 2005).

1.2 *Mimosa pigra* dan aktiviti biologi ekstraknya

Mimosa pigra (Fabaceae) ialah sejenis rumpai yang mengancam persekitaran tropika dan dikatakan telah mengganggu ekosistem semulajadi di Australia dan Asia (Robert 1982; Lonsdale *et al.*, 1995). Pada tahun 1947, *M. pigra* telah diperkenalkan dari negara Indonesia ke Thailand sebagai baja hijau (tumbuhan yang ditanam untuk jangka pendek dan kemudiannya dibajak di dalam tanah semasa masih hijau bertujuan untuk meningkatkan baja organik di dalam tanah) dan tanaman teduhan bagi ladang tembakau (Napompeth, 1983; Wara-Aswapati, 1983). Terdapat juga beberapa kajian yang telah menunjukkan bahawa *M. pigra* mempunyai nilai dalam bidang perubatan. Akar *M. pigra* dikatakan dapat mengubati selsema dengan menghidunya, ekstrak batangnya pula digunakan sebagai pencuci mulut untuk sakit gigi, dan buahnya digunakan sebagai ubat mata (Anon, 1980). Kebetulan ia juga digunakan sebagai rawatan gigitan ular di Afrika (Irvine, 1961). Di Sumatera, ekstrak rendaman air daun *M. pigra* yang dipanggang digunakan untuk merawat lemah jantung (Grosvenor *et al.*, 1995). Dengan kesemua pengetahuan ini, penskrinan fitokimia pada *M. pigra* telahpun dijalankan, begitu juga dengan ujian aktiviti antimikrob. Englert *et al.* (1995) telah menjumpai triterpenoid saponin di dalam *M. pigra*. Triterpenoid saponin wujud sebagai konjugat triterpena yang berfungsi sebagai antivirus (Simoes *et al.*, 1999). Selain itu, Chen *et al.* (2005) telahpun menjumpai beta-rizobia (sejenis nodul) di dalam *M. pigra* yang berfungsi sebagai pengikat nitrogen di dalam tanah bagi pertumbuhan sesuatu tumbuhan. Manakala kajian antimikrob telah dijalankan oleh Vallado *et al.* (2000) pula mendapati keberkesanan ekstrak *M. pigra* terhadap bakteria gram positif (*S. aureus* dan *B. subtilis*), kesan anti *C. albicans* dan juga mempunyai kebolehan menghalang pertumbuhan *P. aeruginosa* (bakteria gram negatif). Selain menunjukkan kesan antimikrob, ekstrak

M. pigra juga dilaporkan mempunyai fungsi sebagai antioksidan semulajadi. Kajian perbandingan aktiviti antioksidan ekstrak *M. pigra* yang telah dijalankan oleh Tan (2005) telah membuktikan keberkesanan ekstrak metanol, kloroform, heksana dan air *M. pigra* dalam merencat pengoksidaan lipid melalui ujian ferik tiosianat. Maka dengan kenyataan di atas, *M. pigra* telah digunakan dalam kajian ini.

1.3 Industri akuakultur di Malaysia dan usaha dalam meningkatkan hasil ikan

Akuakultur memainkan peranan penting dalam sektor perikanan di Malaysia. Ikan, merupakan sumber protein terpenting dalam makanan harian rakyat Malaysia dan sebahagian besar ikan di negara ini diekspor ke pasaran antarabangsa. Di samping itu, permintaan ikan dari luar negara adalah semakin meningkat dari tahun 2000 ke 2001, iaitu dari 144,590 tan hingga ke 161,339 tan. Di bawah Polisi Agrikultur Kebangsaan ke-3 (1998-2010), Malaysia mensasarkan penghasilan sebanyak 1.93 juta tan ikan pada setiap tahun dan kira-kira RM8.3 billion bermula dari tahun 2010. Penghasilan akuakultur dijangka akan menghasilkan sebanyak 600,000 tan sebelum 2010, di mana sebanyak 400,000 tan dihasilkan melalui marikultur manakala sebanyak 200,000 tan disumbangkan oleh perkembangan industri ikan air tawar (Aquaculture in Malaysia, 2006).

Dalam rancangan Malaysia ke-3 (1976-1980) sebelum ini, kerajaan telahpun mengiatkan perikanan di Gelang Patah, Johor dengan mengkaji pemakanan ke atas lima jenis ikan yang terdapat di persisiran air Malaysia iaitu *Penaeus monodon* dan *P. merguensis* (udang), *Lates calcarifer* (siakap), *Epinephalus tauvina* (kerapu) dan *Siganus* spp. (dengkis). Kajian ke atas pemakanan ikan adalah penting kerana ia mewakili 50% daripada kos penghasilan akuakultur; keseimbangan diet pemakanan ikan bukan sahaja dapat meningkatkan pertumbuhan ikan, malah ia juga dapat menjimatkan kos pengeluarannya (Chow, 1984). Dalam Polisi Pertanian Kebangsaan ke-3 (NAP-3) baru-baru ini, kerajaan telah memperuntukkan dana sebanyak RM6.96 billion untuk sektor pertanian dan perikanan bagi meningkatkan

persaingan dan produktiviti produk perikanan. Polisi ini akan mempertingkatkan eksport ikan sebanyak 66% dari 245,178 metrik tan pada tahun 2000 ke 407,299 metrik tan pada tahun 2005 (Hashim, 2007). Selain itu, di bawah Rancangan Malaysia ke-9 (2006-2010), kerajaan Malaysia telah menyediakan peruntukan sebanyak RM 40 juta bagi melaksanakan program penanaman pokok bakau di kawasan-kawasan persisiran pantai negara untuk tujuan penyelidikan dan pembangunan bagi kepelbagaian hidupan marin dan organisma kecil yang lain di mana secara tidak langsung dapat memperkayakan hasil sumber pantai yang berpotensi untuk negara (Pokok bakau, 2006).

Selain daripada ikan untuk makanan harian, industri ikan perhiasan (contoh *Cyprinus carpio*, *Discus* spp., *Pygocentrus* spp. dan lain-lain) juga dijangka menyumbangkan sebanyak RM190 juta sebelum 2010. Lebih daripada 70% ikan perhiasan Malaysia telah dieksport ke Amerika, England, Jerman, Itali, Hong Kong, Sepanyol, Jepun dan Taiwan, dan kini Malaysia menduduki tempat ke-2 selepas Singapura dalam mengeksport ikan perhiasan secara domestik (Star Biz, 2006).

Banyak usaha dalam meningkatkan pengeluaran melalui akuakultur telahpun dijalankan. Antaranya ialah pengubahsuaian genetik ikan, peningkatan tempoh penyimpanan, pemberian diet makanan ikan yang lebih berkesan dan lain-lain lagi (Huang *et al.*, 2003; Muchisin *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2005). Usaha dalam mencari alternatif terbaik dalam penyimpanan gamet dan embrio pada suhu rendah bagi beberapa spesies ikan dan pengkulturan *in-vitro* *Oreochromis* spp. telah pun giat dijalankan. Daripada 32 jenis lokus protein dari kaedah elektroforesis, sebanyak 18 jenis spesies polimorf (spesies yang mempunyai individu-individu yang berbeza-beza bentuknya), dalam 7 jenis keturunan (strain) tilapia (*O. mossambicus*; *O. niloticus*, keturunan Chitralada; *O. niloticus*, keturunan Philippines; *O. niloticus*, keturunan Israel; *O. niloticus*, keturunan tempatan; *O. aureus*, keturunan Singapura; keturunan hibrid Taiwan) menunjukkan hubungan rapat dari segi genetik antara satu sama lain (Selvaraj *et al.*, 1994). Persamaan genetik ini mungkin berguna semasa melakukan

kerja pemeliharaan. Ini bermaksud cuma satu set keturunan sahaja yang perlu dipelihara jika terdapat persamaan genetik dari segi tingkah laku (Tan *et al*, 1998, Mukherjee, 2001).

1.4 Objektif kajian

Objektif utama kajian ini ialah mengkaji keberkesanan ekstrak *M. pigra* sebagai bahan antioksidan semulajadi, dibandingkan dengan antioksidan sintetik (BHT, hidroksitoluen berbutil secara *in-vitro*). Ekstrak terbaik akan diaplikasikan secara *in-vivo* terhadap model tilapia. Keberkesanan antioksidan ekstrak akan ditentukan berdasarkan prestasi pertumbuhan, kestabilan oksidatif dan komposisi asid lemak dan protein selepas penyimpanan yang singkat. Untuk mencapai matlamat ini, kajian telah dibahagikan kepada beberapa objektif spesifik seperti yang berikut :

1. Mengenalpasti jenis sistem pelarut, kaedah pengekstrakan dan organ *M. pigra* yang menunjukkan aktiviti antioksidan terbaik. Aktiviti antioksidan secara *in vitro* ditentukan dengan menggunakan kaedah ferik tiosianat (FTC) dan asid tiobarbiturik (TBA).
2. Ekstrak-ekstrak yang menunjukkan aktiviti antioksidan yang baik akan diuji sekali lagi setelah menyingkirkan kandungan klorofilnya
3. Menguji jumlah fenolik (mgGAE/g ekstrak) ekstrak krud dan ekstrak tanpa klorofil dan mengenalpasti sebatian utama yang terkandung dalam ekstrak terbaik antioksidan dengan menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis (TLC), spektrum cahaya ultra ungu ternampak dan kromatografi cecair dan spektrofotometer jisim (LC-MS).
4. Menentukan kandungan ekstrak (gram) yang paling sesuai untuk dimasukkan dalam diet ikan.

5. Menilai pengaruh ekstrak *Mimosa pigra* dan kawalan (BHT) terhadap pertumbuhan dan komposisi asid lemak ikan tilapia terhadap pertumbuhan, komposisi asid lemak dan histologi hati ikan tilapia.
6. Menilai kesan diet antioksida masing-masing pada tempoh penyimpanan berlainan (dari jam pertama hingga jam kelapan pada suhu bilik, 28°C) terhadap kestabilan oksidatif isi tilapia.
7. Mengkaji perubahan protein isi tilapia yang diberi makan diet antioksida berlainan pada tempoh penyimpanan dari jam pertama hingga kelapan.

BAB 2 TINJAUAN BACAAN

2.1 *Mimosa pigra*

Mimosa pigra merupakan rumpai yang didapati secara meluas di sekitar kawasan Afrika, Asia Tenggara, Amerika Syarikat dan juga Australia. Pokoknya yang berduri telah menjadi makanan penting bagi haiwan herbivor (Lonsdale *et al.*, 1995) dan keupayaan membiak dengan cepat telah menjadikannya sebagai spesies merbahaya di kawasan yang dijajah (ANCA 1996).

Mimosa pigra merupakan tumbuhan renek jenis berkayu daripada famili Fabaceae yang boleh mencapai ketinggian sehingga 6 meter dengan batangnya berbulu yang mempunyai duri sepanjang kira-kira 7 milimeter (Plat 2.1). Ia dikenali sebagai Semalu Gajah di Malaysia dengan daunnya jenis bipinat, 6-16 pasang daun dan sensitif apabila disentuh. Petiol daunnya bersaiz 20 sentimeter panjang dengan setiap pina mempunyai 24-31 pasang daun muda. Bunganya kecil, kira-kira 1 sentimeter diameternya, berwarna ungu muda ke merah jambu, bertangkai, padat pada jambak jenis kepala yang berbentuk sfera dengan 100 bunga per kepala. Terdapat 8 stamen pada setiap bunga (Plat 2.2). Buahnya pula jenis kekacang mendatar yang bersegmen dan berbulu kasar. Saiznya mencapai sehingga 8 sentimeter panjang dan 1.4 sentimeter lebar, dengan 9-24 segmen bagi setiap individu dan setiap satu mengandungi sebiji benih; kekacang terhasil dalam jambak palmat yang mempunyai 7 tangkai kekacang pada hujung batang (ANCA 1996) (Plat 2.3).



Plat 2.1 Pokok *Mimosa pigra*



Plat 2.2 Bunga *Mimosa pigra*



Plat 2.3 Daun dan kecang *Mimosa pigra*

2.2 Ikan tilapia (*Oreochromis* spp.)

Tilapia dipercayai berasal dari Afrika tropika, Israel dan Jordan (Trewavas, 1983; Stiassny, 1991). Kini, ia telahpun disebarkan ke seluruh dunia menjadikannya salah satu spesies yang penting bagi sektor perikanan (Lovshin, 1997).

Ikan tilapia tergolong dalam famili Cichlidae. Bentuk badannya padat dan leper, mempunyai hanya satu lubang hidung pada setiap belah kepala. Banyak spesies dari kumpulan tilapia ini telahpun dibawa ke seluruh dunia untuk tujuan akuakultur. Dengan itu, ia menjadi spesies yang paling berjaya diperkenalkan.

Salah satu kebaikan menternak tilapia dalam industri akuakultur ialah pemberian makanannya adalah pada aras trofik yang rendah atau boleh dieksploitasi di pelbagai perairan (Liaw & Fung, 2000). Penternak dapat menternak lebih banyak tilapia dalam kolam yang bersaiz kecil kerana mortalitinya tidak bersandarkan densiti. Tilapia akan menggunakan apa sahaja sumber yang terdapat dalam air sebagai makanan (disebabkan mereka jenis omnivor) dan membolehkan para penternak menternaknya secara ekstensif atau intensif. Dalam akuakultur ekstensif, tilapia dapat hidup dan membesar dengan memakan alga dan detritus organik yang sedia ada di dalam kawasan tersebut; manakala dalam sistem intensif, tilapia boleh bergantung kepada diet yang disediakan khas termasuk kadar protein yang tinggi untuk pertumbuhan (Stickney, 1996, Shiau, 1997, Watanabe *et al.*, 1997).

Tilapia merupakan ikan yang paling mudah dan menguntungkan untuk ditenak. Ini bukan sahaja kerana ia jenis ikan omnivor dan memerlukan khasiat pemakanan yang rendah, malah anak ikan tilapia tidak melalui fasa plankton (planktonic phase). Ini bermaksud mereka tidak perlu bergantung kepada organisma mikroskopik, termasuk alga dan protozoa, terutamanya berdekatan dengan permukaan air dan ini dapat mengurangkan bilangan pemangsanya. Selain itu, tilapia boleh dikulturkan dalam kualiti air yang rendah, ini termasuk (a) air kumbahan kolam (Edwards, 1990); dan (b) air buangan efluen primer dan sekunder (Khalil & Hussein, 1997). Setakat ini, tiada laporan yang melaporkan tentang kesan pemakanan ikan yang dipelihara

dalam air kumbahan kolam yang menjejaskan kesihatan manusia walaupun aktiviti ini telah dijalankan sejak 1930 (Nandeesh, 2002). Dalam eksperimen Yi *et al.* (2003), air kumuhan dalam tangki ikan keli telah digunakan semula oleh ikan tilapia sebagai pembekal nutrien. Air kumuhan yang mengandungi fitoplankton tidak lagi dapat diadaptasi oleh ikan keli itu sendiri tetapi telah menjadi sumber makanan kepada tilapia. Ini telah membuktikan bahawa ikan tilapia mempunyai daya tahan yang lebih tinggi daripada ikan keli terhadap kualiti air dengan jumlah nitrogen ammonia, nitrit, nitrat dan fosforus yang tinggi.

Tilapia, boleh dikacuk dengan mudah, pengkulturan mereka tidak perlu melalui 'paksaan' pembiakan baka (boleh membiak sendiri) dan tempat pengkulturannya boleh berkongsi dengan ikan lain. Ciri penting ini menyebabkan tilapia boleh ditenak bersama ikan lain dan menghasilkan baka untuk dijual, dimakan, atau penstockan semula malah dapat menjimatkan kos untuk tempat pengkulturan (Little & Hulata, 1998). Dalam kajian Tian *et al.* (2001), polikultur antara tilapia dengan udang dan moluska telah meningkatkan keberkesanan dalam penternakan udang dengan mengurangkan pencemaran air yang disebabkan efluen. Sisa (zooplankton dan detritus organik) yang dihasilkan oleh udang akan dikitar semula atau digunakan oleh tilapia dan moluska pada aras trofik berbeza sebagai sumber makanan mereka. Dengan itu, sumber yang dikitar semula dan bukan sahaja digunakan pada peringkat aras trofik berbeza tetapi pada setiap pusingan kitaran semula. Walaupun *Oreochromis mossambicus* lazim diperkenalkan, akan tetapi ikan tilapia *Oreochromis niloticus* (Plat 2.4) juga dikulturkan secara besar-besaran di seluruh dunia termasuk negara kawasan tropika dan subtropika. Pengeluaran ikan tilapia di Malaysia telahpun mencecah 390.44 juta tan pada tahun 2005 (FAO, 2005).



Plat 2.4 Ikan tilapia merah, *Oreochromis* sp.

Kajian penambahbaikan tilapia telahpun dillakukan bagi mempertingkatkan lagi kualiti isi tilapia dan salah satu daripadanya ialah memberi warna (merah) yang lebih menarik tanpa bintik hitam. Mather *et al.* (2001) telah melakukan pemilihan massa (kaedah pembiakbakaan pada tumbuhan atau binatang dengan memilih individu daripada seluruh populasi berdasarkan fenotip individu tersebut) ke atas tilapia hibrid (*Oreochromis niloticus* x *Orechromis mossambicus*) dan keputusan menunjukkan pemilihan massa dapat mengurangkan bintik hitam yang ada pada badan ikan dan meningkatkan fenotip merah tanpa mengganggu pertumbuhan ikan tersebut. Selain itu, Boonyaratpalin & Unprasert (1989) telah menggunakan spirulina, tepung ranggi *Tangetes patula*, tepung kepala udang dan kunyit bagi meningkatkan pigmentasi badan ikan *Oreochromis niloticus*. Didapati kesemuanya menunjukkan warna merah, keemasan dan jingga masing-masing pada badan ikan.

Penyimpanan ikan pada tempat sejuk sering kali menjadi masalah kerana kualiti ikan akan menurun dengan peningkatan tempoh penyimpanannya. Arannilewa *et al.* (2005) telah mengatakan bahawa kualiti (tekstur, bau dan warna) ikan *Sarotherodon galiaenus* yang lebih baik boleh dicapai pada sepuluh hari pertama daripada hari seterusnya (enam puluh hari) semasa penyimpanan dalam peti sejuk.

Selain itu, until yang terapung adalah lebih baik daripada until yang tenggelam semasa pemberian makanan kepada tilapia. Ini kerana until terapung

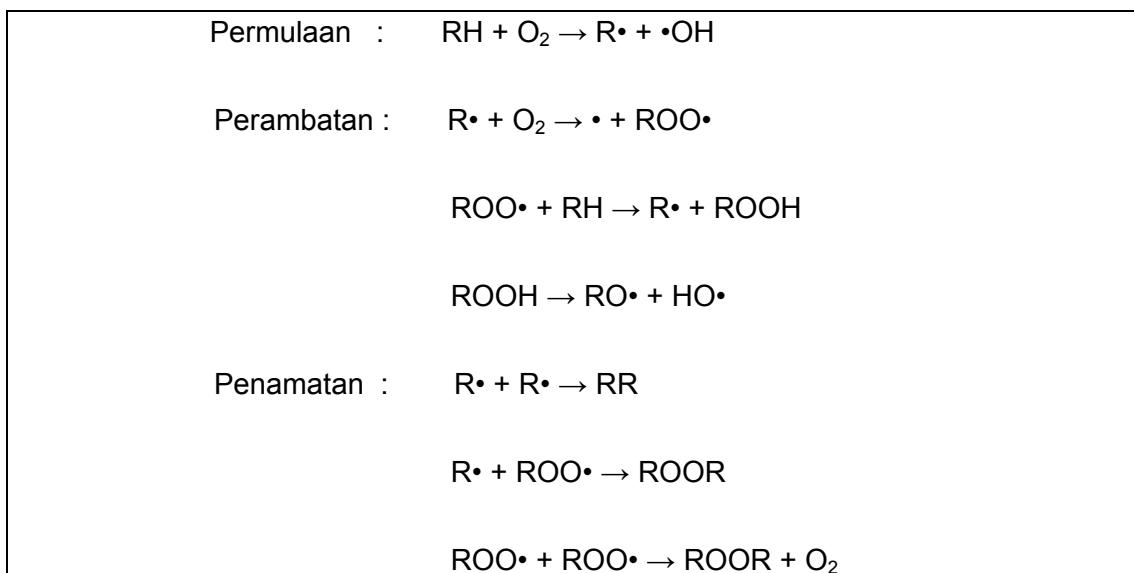
membolehkan penternak memerhati reaksi ikan (makan atau tidak makan) semasa pemberian makanan diberikan (Harston, 2007). Akan tetapi, kajian Cruz & Ridha (2001) telah menunjukkan pemberian makanan until tenggelam adalah lebih baik daripada until terapung dari segi kadar pertumbuhan. Didapati saiz, kadar pertumbuhan spesifik (SGR) dan kadar penukaran pemakanan (FCR) tilapia juvenil yang diberi makan until tenggelam adalah lebih baik daripada ikan yang diberi makan until terapung walaupun kos penghasilan until tenggelam adalah tinggi.

2.3 Pengoksidaan lipid

Lipid merupakan sumber utama dalam menyumbangkan tenaga kepada ikan (Cossins & Lee, 1985). Ikan dapat bertahan dalam suatu jangka masa yang panjang di bawah keadaan kekurangan makanan. Sebagai contoh, ikan salmon yang menggunakan beberapa minggu migrasi ke hulu untuk bertelur, akan menggunakan lipid yang disimpan di dalam badannya sebagai bahan bakar untuk membolehkannya meneruskan perjalanannya yang memerlukan banyak tenaga (National Research Council, 1973; Cowey & Sargent, 1977). Maka adalah penting bagi ikan mengekalkan lipidnya di dalam badan.

Pengoksidaan lipid ialah suatu tindak balas di mana radikal bebas membentuk tindak balas rangkaian (boleh dirangsang oleh radikal hidroksil) yang menyerang asid lemak politatkepu dalam membran dan lipoprotein plasma dan mengakibatkan kemusnahan oksidasi (Halliwell, 1991; 1996). Pengoksidaan lipid pada isi akan merosakkan kualiti semasa penyimpanan sejuk, malah akan menyebabkan perubahan rasa, pigmen dan vitamin (Thanonkaew *et al.*, 2006). Secara keseluruhannya, pengoksidaan boleh dibahagikan kepada tiga fasa : (1) permulaan, pembentukan radikal bebas; (2) perambatan, kitar tindak balas radikal bebas; dan (3) penamatan, pembentukan produk tanpa radikal (Rajah 2.1). Dalam contoh Rajah 2.1, RH ialah asid lemak tak tepu; R• ialah radikal bebas yang dibentuk

dengan menyingkirkan H dari atom karbon ikatan ganda dua asid lemak; dan ROOH ialah hidroperoksida, salah satu agen pemula produk oksidasi yang membentuk komponen kehilangan rasa dan bau, contohnya dalam produk sekunder ialah heksanal, pentanal dan malonaldehid (Berg & Haenen, 2001).



Rajah 2.1 Tiga fasa tindak balas pengoksidaan lipid: (1) permulaan, (2) perambatan dan (3) penamatan.

Banyak kajian telah dijalankan dalam menghalang oksidasi lipid dalam badan ikan. Khalid (2007) telah menunjukkan bahawa natrium asetat (NaA) dan natrium sitrat (NaC) dapat melambatkan pengoksidaan lipid ikan salmon dengan mencelupkan ikan tersebut di dalam larutan garam pra-sejuk (4°C). Beliau juga mencadangkan bahawa NaA dan NaC ini boleh digunakan sebagai pengawet ikan semasa penyimpanan sejuk. Selain menggunakan garam, teknik penyinaran (irradiation) juga merupakan teknologi terkini yang dapat meningkatkan mutu, kebersihan dan jangka masa penyimpanan sesuatu makanan (Aimed, 1993). Penyinaran ialah sejenis rawatan yang menggunakan radiasi ion bertenaga tinggi daripada alat radioisotop untuk membunuh atau mengecutkan sel seperti sel kanser dan tumor. Kadang-kala penyinaran dilakukan ke atas isi haiwan untuk membunuh mikroorganisma dan mengurangkan bilangan mikrob yang hadir akibat amalan yang

tidak bersih (Diehl, 1990; IAEA, 1991). Riebroy *et al.* (2007) telah menjalankan teknik penyinaran ke atas ikan pencekup (*Priacanthus tayenus*). Didapati penyinaran sebanyak 6 kGy (kiloGray) mungkin dapat mengurangkan pengoksidaan lipid dan protein lebih baik daripada kawalan (tiada penyinaran) dan menghalang pertumbuhan mikrob dalam ikan tersebut.

Penggunaan ekstrak sebagai antioksidan dalam diet ikan juga lazim dipraktikkan dalam menghalang pengoksidaan lipid. Alonso *et al.* (2007) telah menggunakan diet gentian anggur antioksidan (GADF, grape antioxidant dietary fibre) sebagai antioksidan dalam penyimpanan sejuk (-20°C) ikan kisar makrel (*Trachurus trachurus*) selama enam bulan. Keputusannya telah menunjukkan GADF telah berjaya menghalang pengoksidaan ikan pada awal tiga bulan dan meningkatkan mutu ikan dengan kandungan bioaktif (flavonoid) yang terdapat dalam GADF. Selain itu, Varelziz *et al.* (1997) juga menjalankan ujian antioksidan ke atas ikan makrel berfilet dan dikisar dengan menggunakan ekstrak rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) selama 120 hari di bawah penyimpanan sejuk (-18°C). Didapati aktiviti antioksidan adalah lebih baik daripada ikan kawalan (tanpa ekstrak). Ini bermaksud penambahan ekstrak rosemary dalam ikan berfilet dan berkisar makrel dapat meningkatkan aktiviti antioksidan apabila disimpan dalam keadaan sejuk pada suatu jangka masa. Selain penggunaan antioksidan ke atas isi ikan, antioksidan juga dipraktikkan ke atas minyak ikan yang merupakan sumber lipid ikan semasa penyediaan diet. Moure *et al.* (2007) telah menunjukkan ekstrak cangkerang badam (*Prunus amygdalus*) mempunyai aktiviti menyingkirkan radikal (DPPH, $EC_{50} < 0.5$ g/l) yang lebih baik daripada antioksidan sintetik (BHA, BHT) dan melindungi minyak ikan daripada oksidasi.

Selain penambahan ekstrak dalam minyak ikan, terdapat kajian yang menunjukkan penggantian minyak sayuran dengan minyak haiwan dalam diet dapat mengurangkan pengoksidaan dalam isi ikan. Pada lazimnya, minyak ikan yang digunakan dalam pelbagai eksperimen adalah minyak hati ikan kod dan ia jarang

dicatatkan di dalam sebarang laporan. Menoyo *et al.* (2005) telah menggantikan minyak ikan dalam diet ikan salmon Atlantik dengan minyak linsid dan ia tidak mempengaruhi pertumbuhan ikan malah kestabilan pengoksidaan lipid isi ikan juga tidak dipengaruhi. Beliau menyatakan bahawa minyak linsid mungkin wujud sebagai antioksida semulajadi dan dapat mengurangkan kandungan asid lemak taktepu (omega-3) yang senang teroksida di dalam isi ikan. Begitu juga dengan kajian Lin & Huang (2007), yang menyatakan bahawa pemberian minyak zaitun sebagai sumber lipid kepada diet kura-kura (*Pelodiscus sinensis*) memberi nilai yang rendah dalam ujian TBARS (bahan yang reaktif terhadap asid tiobarbiturik). Ini menunjukkan bahawa aktiviti menghalang pengoksidaan lipidnya adalah lebih tinggi daripada pemberian minyak ikan dalam diet kura-kura.

2.4 Flavonoid

Flavonoid merupakan komponen polifenolik yang terdapat dalam tumbuhan (Kris-Etherton *et al.*, 2002), terutamanya pada tumbuhan vaskular (Middleton & Kandaswami, 1993). Ia banyak terkumpul pada bahagian daun, biji, batang dan bunga yang berpigmen merah atau biru. Hampir 4,000 jenis flavonoid telah dikenalpasti dan komponen flavonoid mampu berfungsi sebagai bahan perlindungan cahaya ultra ungu, antipatogen dan antioksida (Harborne & William, 2000). Bukan itu sahaja, flavonoid juga dikenali sebagai 'pengubahsuai gerak balas biologi semulajadi' disebabkan banyak eksperimen telah menunjukkan kebolehan flavonoid dalam mengubahsuai tindak balas dalam badan dalam menghalang aktiviti antialergi, antinflamatori, antimikrob dan antikanser (Oganeshyan *et al.*, 1991; Kosalec *et al.*, 2005; Yamamoto & Gaynor, 2006). Penggunaan flavonoid yang meluas, kepelbagaian dan ketoksikan yang rendah berbanding dengan komponen aktif tumbuhan lain (seperti alkaloid) penting untuk haiwan dan manusia dalam memilih diet makanan seharian mereka. Flavonoid bukan sahaja boleh didapati pada tumbuhan, malah ia juga boleh dijumpai pada tisu dewasa sayap rama-rama (contoh

Polyommatus icarus) melalui pengambilan diet semasa peringkat larva (Knuttel & Fiedler, 2001).

Flavonoid dikatakan mempunyai aktiviti antioksidasi (Bors & Saran, 1987; Rice-Evans *et al.*, 1995, 1996; Cook & Samman, 1996) walaupun terdapat sebahagian komponen fenolik yang juga berfungsi sebagai pro-antioksidasi di bawah keadaan tertentu (Decker, 1997). Flavonoid mengandungi kedua-dua belah ikatan lipofilik dan hidrofilik (Fuhmam & Avmam, 2001) serta mempunyai pelbagai jenis mekanisme yang mempengaruhi tindak balas antioksidasi. Yang pertama, ia mungkin menghalang sesetengah tindak balas radikal bebas secara terus dan memutuskan rantai peroksidasi lipid (Emanuel & Lyaskovskaya, 1967; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Kedua, struktur kimia flavonoid yang berlainan bertindak sebagai penderma hidrogen kepada radikal bebas mengikut mekanisme masing-masing (Jovanovic *et al.*, 1994; Rice-Evans *et al.*, 1996). Ketiga, flavonoid mungkin menjadi agen pengkelat yang boleh bertindak balas dengan ion logam dan membentuk kompleks larut air yang stabil dengannya untuk menghalang pengoksidaan lipid dengan mengitar semula agen antioksidasi (Emanuel & Lyaskovskaya, 1967; Shahidi & Wanasundara, 1992). Kini, pengguna dan pengilang makanan telah menaruh minat terhadap fungsi flavonoid sebagai antioksidasi dalam bidang perubatan, terutamanya keupayaan flavonoid sebagai penghalang penyakit kanser dan kardiovaskular dan kesan baik pada buah-buahan, sayuran, teh dan wain merah juga disebabkan oleh komponen flavonoid yang terdapat di dalamnya (Bravo, 1998; Darlington & Stone, 2001; Premier, 2002; Cieslik *et al.*, 2005).

2.4.1 Kesan penggunaan flavonoid pada ikan

Banyak laporan yang telah melaporkan tentang keberkesanan flavonoid sebagai antioksidan pada ikan. Ramanathan & Das (1992) telah membuat ujian pengoksidaan lipid ke atas isi ikan 'ground' (*Scomberomorus commersoni*) yang telah diberi makan pelbagai jenis flavonoid. Didapati beberapa jenis flavonoid seperti kuersetin, mirisetin, asid elagik, morin, asid tanin dan kampferol dapat menghalang pengoksidaan lipid dalam isi ikan mentah selepas penyimpanan selama 14 hari pada suhu 4°C. Kesemua ikan yang makan diet mengandungi flavonoid tersebut mempunyai aktiviti antioksidan yang lebih baik daripada diet kawalannya, BHT (hidroksitoluen berbutil). Ini menunjukkan diet yang mengandungi flavonoid mempunyai aktiviti antioksidan yang lebih baik daripada diet kawalan, BHT. Hsieh *et al.* (1988) juga melaporkan keupayaan fisetin dan kuersetin dalam menghalang pembentukan 12-liposigenesis yang menyebabkan hidroperoksidasi asid lemak (oksidasi lipid) pada insang ikan 'trout' pelangi (*Oncorhynchus mykiss*).

Selain daripada lipid, protein juga adalah penting bagi mengekalkan tahap nutrisi yang ada dalam badan ikan untuk pertumbuhan yang optimum. Flavonoid mampu bergabung dengan protein spesifik dan mempengaruhi aktiviti biologinya. Reseptor hormon atau enzim merupakan salah satu contoh molekul sasaran protein. Seperti contoh, genistein (isoflavon) yang terdapat dalam produk soya telah merangsang kesan estrogenik (pengeluaran hormon estrogen yang membantu pertumbuhan dan ciri-ciri seks betina) ikan *Oryzias latipes* dalam balikan seks dan menukar ikan jantan kepada ikan betina subur secara genetik (Scholz *et al.*, 2004). Begitu juga dengan Pollack *et al.* (2003) yang mengkaji keberkesanan genistein ke atas ikan *Morone saxatilis* dengan menyuntik genistein ke atas ikan selama tiga minggu dan keputusannya mendapati ikan tersebut memberi rangsangan terhadap estrogen. Selain itu, kajian juga pernah melaporkan tentang keberkesanan flavonoid menghalang pertumbuhan sel kanser pada bahagian badan ikan. Tsuji *et al.* (2006) melaporkan bahawa pengumpulan 5,7-dimetoksiflavon dalam hati ikan *Fundulus*

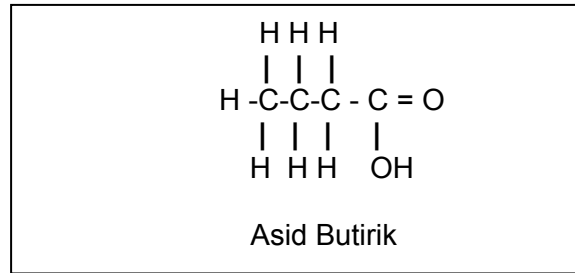
heteroclitus dapat menghalang aktiviti molekul kanser dan meningkatkan kestabilan metabolik ikan tersebut. Begitu juga dengan Bai & Gatlin (1992), eksperimen mereka telah menunjukkan pemberian diet yang mengandungi rutin kepada ikan *Ictalurus punctatus* dapat meningkatkan berat badan ikan dan kestabilan oksidasi isi ikan dapat dikekalkan.

Berdasarkan laporan-laporan yang ada, secara keseluruhannya boleh dikatakan bahawa flavonoid mungkin mampu mempengaruhi metabolisme ikan dengan menghalang pengoksidaan lipid dan merangsang sesetengah enzim dan membantu dalam mempertingkatkan kualiti ikan dalam industri akuakultur.

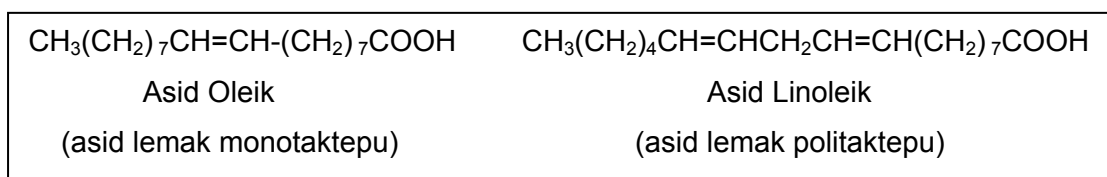
2.5 Asid lemak

Proses oksidasi menyebabkan lipid dan protein terdegradasi dan ia merupakan salah satu mekanisme utama yang menyebabkan kerosakan kualiti (rasa, bau, warna) pada daging ayam, itik dan khinzir (Jensen *et al.*, 1998). Lipid merupakan komponen utama dalam diet ikan kerana ia memainkan peranan penting sebagai molekul pembekal tenaga dan asid lemak perlu semulajadi (Rueda *et al.*, 2001). Asid lemak terdiri daripada unsur karbon (C), hidrogen (H) dan oksigen (O) yang terikat bersama kumpulan karboksil (-COOH) pada hujung untuk membentuk satu rantai karbon (Rajah 2.2).

Asid lemak tepu mempunyai kesemua H yang boleh terikat dengan atom karbon, maka ia tidak mempunyai ikatan ganda dua antara C (Rajah 2.2). Manakala asid lemak monotaktepu mempunyai satu ikatan ganda dua dan asid lemak politaktepu mempunyai lebih daripada satu ikatan ganda dua (Rajah 2.3).

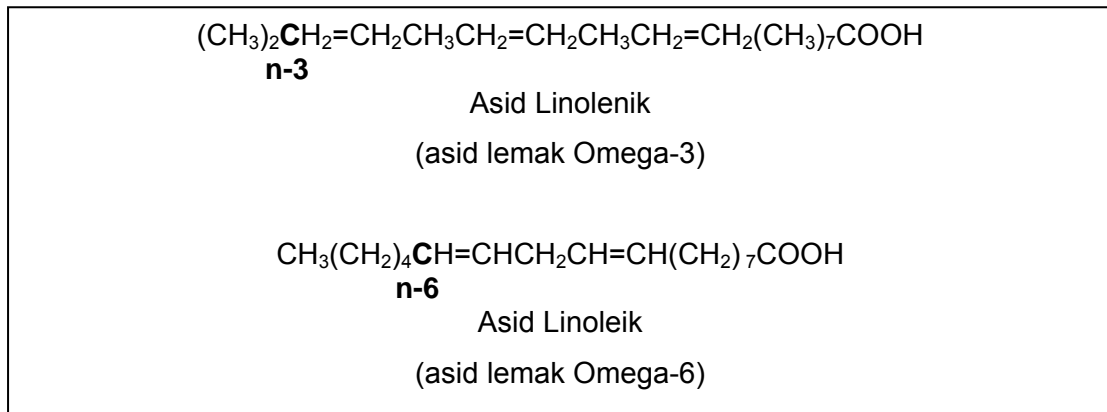


Rajah 2.2 Contoh asid lemak yang terdiri daripada gabungan karbon (C), hidrogen (H) dan oksigen (O)



Rajah 2.3 Contoh asid lemak bagi mono dan politaktepu

Asid lemak biasanya diwakili oleh simbol seperti C18:2, yang bermaksud asid lemak tersebut terdiri daripada rangkaian 18 karbon dan mempunyai dua ikatan ganda dua (Scientific Psychic, 2004). 'Omega' bermaksud karbon yang terbentuk pada akhir rangkaian kerana omega merupakan perkataan terakhir dalam sistem abjad Yunani. Seperti contoh, asid linoleik merupakan asid lemak omega-6 kerana ia merupakan karbon keenam dari karbon 'omega' sebelum terbentuknya ikatan ganda dua pertama. Maka, dengan mengetahui lokasi di manakah ikatan ganda dua itu mula terbentuk, molekul-molekul ini boleh dibahagikan kepada dua kelas yang lazim dijumpai iaitu omega-3 dan omega-6 (Stehr & Heller, 2006). Contohnya α -asid linolenik (omega-3, C18:3n3) dan asid linoleik (omega-6, C18:2n6) (Rajah 2.4).



Rajah 2.4 Contoh asid lemak Omega-3 dan Omega-6 (n bermaksud kedudukan)

Salah satu sumber lipid atau asid lemak dalam badan ikan adalah daripada minyak haiwan atau minyak tumbuhan semasa penyediaan diet makanan ikan. Contoh sumber lipid yang digunakan adalah seperti minyak kacang soya, minyak kelapa sawit dan minyak hati ikan kod (Benjakul *et al.*, 2004; Kumaraguru *et al.*, 2005; Cavalheiro *et al.*, 2007). Berikut (Jadual 2.1) ialah peratusan komposisi asid lemak bagi minyak kacang soya, minyak kelapa sawit dan minyak hati ikan kod secara amnya (Fats and Oils, 2007; Wikipedia, 2007).

Jadual 2.1 Peratusan komposisi asid lemak bagi minyak kacang soya, minyak kelapa sawit dan minyak hati ikan kod (Fats and Oils, 2007; Wikipedia, 2007).

% Komposisi asid lemak			
Asid lemak	Kacang soya	Kelapa sawit	Hati ikan kod
C14:0	-	0-15	8
C16:0	8-13	22-46	17
C16:1	11	0-2.5	7
C18:0	2-5	0.5-5	-
C18:1	17-26	36-68	22
C18:2(n-6)	50-62	2-20	5
C20:0	<1	<0.5	17
C20:1	<0.4	-	-
C22:0	<0.5	-	22
C22:0	-	-	-

Perbandingan kesan penggunaan antara minyak haiwan (ikan) dan minyak tumbuhan (kacang soya, kelapa sawit dan lain-lain) sering dilakukan terhadap isi ikan dari segi kadar pertumbuhan, komposisi asid lemak, pengoksidaan lipid dan lain-lain lagi. Piedecausa *et al.* (2007) telah menggantikan minyak ikan kepada minyak kacang soya dan minyak linsid ke atas diet ikan *Diplodus puntazza* selama 92 hari. Keputusan menunjukkan penggunaan minyak kacang soya tidak mempengaruhi pertumbuhan ikan malah menunjukkan indeks hepatosomatik yang lebih tinggi daripada penggunaan minyak ikan. Penggunaan minyak linsid juga menunjukkan kandungan komposisi asid lemak α -linoleik asid dan linoleik asid dalam isi ikan adalah lebih tinggi daripada penggunaan minyak ikan. Kandungan asid linoleik dan α -linoleik asid ini penting kerana kebolehannya menukarkan sendiri ke asid arakidonik (ARA), asid eikosapentanoik (EPA) dan asid dokosaheksanoik (DHA), yang penting untuk ikan marin sebagai asid lemak perlu di dalam badan. Walaupun begitu, komposisi C18:4n3 (asid stearidonik), C20:4n6 (asid arakidonik), C22:5n3 (asid dokosapentanoik), C20:5n3 (EPA) dan C22:6n3 (DHA) adalah tertinggi dalam penggunaan minyak ikan dibandingkan dengan minyak kacang soya dan linsid. Bell *et al.* (2002) juga telah membuat perbandingan antara kesan pemakanan minyak kelapa sawit dengan minyak ikan pada diet ikan *Salmo salar*. Didapati ikan yang makan diet minyak kelapa sawit mempunyai kadar pertumbuhan dan kadar penukaran makanan (FCR) yang hampir sama dengan ikan yang makan diet minyak ikan dan tiada kesan negatif terhadap kesihatan ikan. Manakala bagi komposisi asid lemak, ikan yang memakan diet minyak ikan mempunyai asid lemak politaktepu (omega-3) yang lebih tinggi daripada ikan yang memakan diet minyak kelapa sawit, manakala asid lemak tepu, monotaktepu dan asid lemak omega-6 dimiliki oleh minyak kelapa sawit. Dalam eksperimen Richard *et al.* (2006) pula, beliau telah membuat perbandingan antara tiga diet ikan [diet A-minyak ikan bilis 100%; diet B-minyak ikan bilis 40%-campuran minyak sayuran 60 (linsid 35%, kelapa sawit 15%, biji sawi 10%; diet C-minyak ikan bilis 40%-campuran minyak sayuran

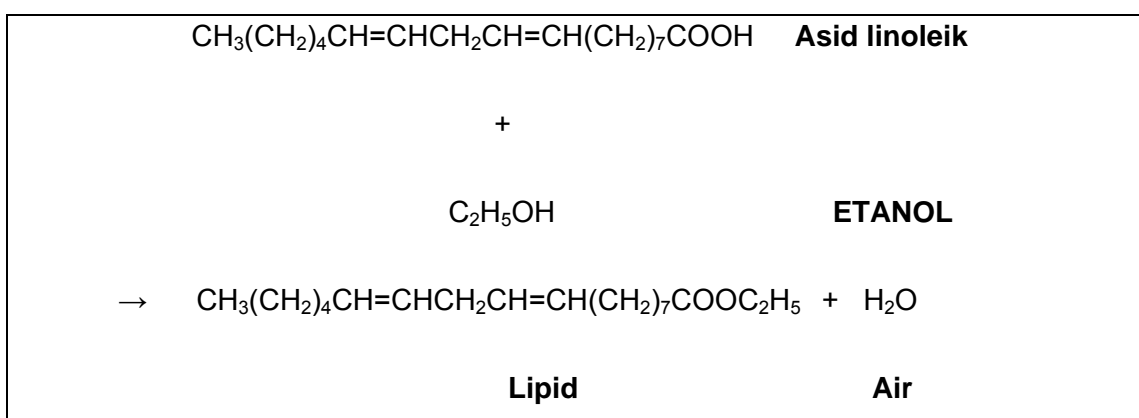
60% (linsid 24%, kelapa sawit 12%, biji sawi 24%)), yang dimakan oleh ikan *Dicentrarchus labrax* selama 64 minggu. Keputusan menunjukkan kadar pertumbuhan ikan, lipid hati dan indeks hepatosomatik adalah hampir sama pada kesemua rawatan diet. Dalam komposisi asid lemak, keputusan menunjukkan diet A mempunyai jumlah kandungan asid lemak tepu tertinggi; diet B mempunyai kandungan asid lemak politaktepu tertinggi, dan diet C mempunyai jumlah asid lemak monotaktepu tertinggi.

Rossi *et al.* (2007) telah membandingkan aktiviti antioksidan lapan jenis minyak sayuran berbeza (tiga minyak kelapa sawit-PO1, PO2, PO3; dua minyak kelapa sawit yang difraksi-PSO1, PSO2; minyak zaitun-OO; minyak bunga matahari-SO; dan minyak goreng organik-campuran bunga matahari dan kacang hazel-SHO). Keputusan beliau menunjukkan aktiviti antioksidan bagi minyak sayuran adalah bergantung kepada kandungan tokoferol dan tokotrienol di dalam sayur tersebut dan semakin banyak kandungan tokoferol atau tokotrienol, semakin meningkat aktiviti antioksidannya.

Maka secara keseluruhannya, penggunaan minyak haiwan (ikan) dalam diet ikan akan menghasilkan asid lemak tak tepu rantai panjang (C18:4n6, C20:5n3, C20:4n6, C22:6n3 dan lain-lain) dibandingkan dengan penggunaan minyak tumbuhan atau sayuran yang kebanyakannya menghasilkan asid lemak rantai pendek [asid lemak tepu dan monotaktepu; C18:3n3 (α -linoleik asid) dan C18:2n6 (asid linoleik)] (Simopoulos, 1991; Lee *et al.*, 1994). Aktiviti antioksidan sesuatu minyak mungkin bergantung kepada komponen yang terdapat dalam bahan mentah yang diekstrak keluar menjadi minyak.

2.6 Pengukuran oksidasi lipid secara *in-vitro* menggunakan ujian ferik tiosianat (FTC) dan asid tiobarbiturik (TBA)

Ujian FTC diperolehi daripada Osawa dan Namiki (1981). Kaedah ini digunakan untuk mengukur darjah oksidasi pada peringkat awal peroksidasi lipid dengan menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 500 nm (Mackeen *et al.*, 2000). Pada kebiasaannya, kaedah ini digunakan untuk menguji aktiviti antioksidasi sesuatu sampel dengan mengukur darjah antioksidasi pada autoperoksidasi asid linoleik (Wang *et. al.*, 2003). Asid linoleik adalah suatu asid lemak (asid karboksilik) yang mempunyai kumpulan berfungsi –COOH. Campuran asid linoleik dan etanol dalam larutan stok sampel akan membentuk ester atau disebut minyak atau lemak yang dilakukan secara sintetik dan dijadikannya sebagai sampel lipid seperti yang ada pada lapisan dalam kulit manusia (Tan, 1997). Rajah 2.5 menunjukkan tindak balas antara asid linoleik dan etanol.



Rajah 2.5 Tindak balas antara asid linoleik dan etanol untuk pembentukan lipid (Tan, 1997)

Jayaprakasha *et al.* (2001) telah menggunakan ujian FTC menunjukkan ekstrak *Vitis vinifera* daripada campuran etil asetat-air suling (17:3) boleh menghalang pengoksidaan lipid sebanyak 86%. Vimala & Adenan (1999) juga menunjukkan ekstrak daun *Morinda citrifolia* dan *Piper sarmentosum* mempunyai aktiviti antioksidasi 100% (ujian FTC) berbanding dengan sampel kawalannya (butil

hidroksitoluen, BHT). Begitu juga dengan Duh & Yen (1997) yang menunjukkan ekstrak air *Chrysanthemum morifolium*, *Hibiscus sabdariffa* dan *Hordeum vulgare* dapat mengurangkan pembentukan peroksida dalam ujian FTC berbanding dengan antioksidan sintetik (α -tokoferol).

Asai asid tiobarbiturik (TBA) adalah suatu kaedah pengukuran pengoksidaan lipid yang lazim digunakan kerana ianya ringkas dan cepat. Asai ini mengukur hasil tindak balas asid tiobarbiturik dengan aldehid berkonjugat seperti malonaldehid (MDA). Malonaldehid iaitu salah satu produk sekunder yang terbentuk akibat penguraian pengoksidaan asid lemak dan dihasilkan melalui pengoksidaan lipid. Semasa pengoksidaan lipid, atom hidrogen akan disingkirkan dan molekul karbon akan membuat penyusunan semula untuk membentuk diena berkonjugat (Mukhopadhyay & Das, 1994) dan menghasilkan tindak balas TBA-malonaldehid kromofor (bahan yang dapat menghasilkan warna), lalu menghasilkan warna merah untuk dikesan oleh spektrofotometer pada jarak gelombang 532 nm. Atau secara ringkasnya boleh dikatakan bahawa warna merah yang terbentuk adalah hasil daripada tindak balas TBA dengan produk oksidasi lipid dan digunakan sebagai indeks untuk mengetahui takat mana pengoksidaan itu telah berlaku (Smith, 1992; Das, 1999; Mackeen *et al.*, 2000). Zainol *et al.* (2003) telah menggunakan ujian TBA menunjukkan ekstrak akar dan daun *Centella asiatica* mempunyai aktiviti antioksidan terbaik berbanding dengan bahagian petiol. Mackeen *et al.* (2000) juga menunjukkan ekstrak bahagian akar, daun dan batang *Garcinia atroviridis* mempunyai aktiviti antioksidan antara 87-93% dalam ujian TBA.